

PCT

ORGANIS

MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ :C12Q 1/68, G01N 33/535
C12Q 1/70

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 94/06933

(43) Date de publication internationale:

31 mars 1994 (31.03.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE93/00063

(22) Date de dépôt international: 21 septembre 1993 (21.09.93)

(30) Données relatives à la priorité:

9200827 22 septembre 1992 (22.09.92) BE

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LAMBDA-TECH S.A. [BE/BE]; Les Beyolettes, B-6953 Forrières (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): REMACLE, José [BE/BE]; Chemin des Pierres 14, B-5020 Malonne (BE). RENTIER, Bernard [BE/BE]; Rue de la Magrée 25, B-4613 Tavieres (BE). ALEXANDRE, Isabelle [BE/BE]; Rue du Centre 3, B-5170 Lesve (BE). MORRIS, Philippe [BE/BE]; Chemin de la Caracole 2, B-5000 Namur (BE). ZAMMATTEO, Nathalie [BE/BE]; Rue Pierre-Fluche 1, B-4800 Verviers (BE).

(74) Mandataire: OFFICE VAN MALDEREN; Place Reine Fabiola 6/1, B-1080 Brussels (BE).

(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: CONJUGATE FOR THE DETECTION AND/OR ASSAY OF A BIOLOGICAL COMPOUND

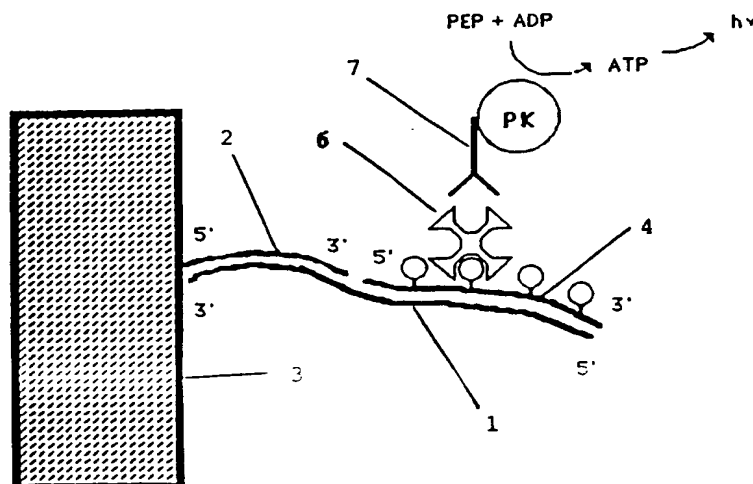
(54) Titre: CONJUGUE DESTINE A LA DETECTION ET/OU AU DOSAGE D'UN COMPOSE BIOLOGIQUE

(57) Abstract

Novel conjugate for the detection and/or assay of a biological compound, consisting of a kinase or a dehydrogenase, the sulphur groups being preferably reduced beforehand, and capable of producing an intermediate compound for use in a bioluminescence system, preferably by means of a luciferase. Said enzyme is coupled to a ligand that was previously activated by a coupling agent and is capable of specifically bonding to said biological compound. The invention also concerns a process for the production of said conjugate, the application of said conjugate in detection and/or assay processes and a diagnostic kit containing same.

(57) Abrégé

L'invention concerne un nouveau conjugué destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique constitué par une kinase ou une déshydrogénase dont les groupes soufres sont de préférence préalablement réduits, et capable de produire un composé intermédiaire utilisable par un système de bioluminescence, de préférence par une luciférase, ladite enzyme étant couplée à un ligand, préalablement activé par un agent de couplage, et susceptible de se lier de manière spécifique audit composé biologique. L'invention s'étend également à son procédé d'obtention, à son application dans des procédés de détection et/ou de dosage et au kit de diagnostic le contenant.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Caméroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

CONJUGUE DESTINE A LA DETECTION ET/OU AU DOSAGE D'UN
COMPOSE BIOLOGIQUE

5 Objet de l'invention

L'invention concerne un nouveau conjugué destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique. L'invention s'étend également à son procédé d'obtention, à son utilisation dans des procédés de détection et/ou de dosage et à la trousse de diagnostic le comprenant.

10 Arrière-plan technologique et état de la technique à la base de l'invention

Beaucoup de procédés de dosages destinés aux tests diagnostiques dans les domaines de la biologie et de la médecine se basent principalement sur la reconnaissance spécifique des anticorps vis-à-vis de leurs antigènes et depuis quelques années sur l'appariement de bases nucléiques (ADN ou ARN). Ces méthodes ont pris des formes diverses en fonction de la complexité des interactions mise en jeu et des moyens d'immobilisation qui sont utilisés pour fixer le ligand à doser (antigène-anticorps ou séquence nucléotidique).

Les techniques de dosage de molécules marquées par un isotope radioactif sont précises et très sensibles. Le désavantage de ces méthodes repose évidemment sur les problèmes liés à l'installation de pièces spéciales et au stockage des déchets, à la sécurité et à la santé dues à l'installation des isotopes radioactifs, ainsi qu'aux contraintes législatives qui en découlent.

30 La technique des sondes froides est basée sur l'utilisation de conjugués enzymatiques composés d'une sonde et d'une enzyme liés de manière covalente. Ces conjugués peuvent être détectés par la conversion d'un substrat de l'enzyme en un produit coloré qui est alors mesuré en spectrophotométrie. C'est le cas de la peroxydase ou de la phosphatase alcaline. Bien que ce dosage permette la détection de ligands en quantités importantes, il s'est révélé trop peu sensible dans le cas de dosages

immunochimiques - lors de détection d'antigènes présents en faible quantité comme les hormones - et - dans le cas d'hybridations génétiques utilisant des sondes à ADN - où les quantités à détecter sont extrêmement faibles.

5 La chémoluminescence se base sur l'émission de lumière à partir d'une molécule chimique qui est excitée. Cette excitation peut être réalisée à partir d'une réaction chimique ou par transfert d'énergie d'une autre molécule. Dans le premier cas, la réaction est habituellement catalysée
10 par une enzyme. Les systèmes les plus employés sont soit la peroxydase en présence de luminol, de peroxyde d'hydrogène, soit la phosphatase alcaline en présence de adamantyl 1,2-dioxétane phényl phosphate (L. Kricka, Chim. Chem., 37, 1472-1481, 1991).

15 Ces systèmes de dosage sont sensibles mais la quantification du signal est très difficile car il est très bref. Une solution serait l'utilisation d'un lanthanide, l'euporium, qui une fois excité produit une fluorescence ayant un temps d'excitation particulièrement long et donc
20 détectable. Il a été utilisé pour la détection d'adénovirus avec un seuil de détection de 0,3 pg de DNA (Syvanen et al., Nuc. Acids Res. 14, 1017, 1986).

 On peut aussi tirer profit du transfert d'énergie de deux molécules : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)
25 et l'isothiocyanate de tetraméthyl rhodamine (TRITC). La première (FITC) est fixée sur la sonde et la seconde sur le DNA de l'échantillon. Lorsque la sonde se fixe sur l'échantillon, les deux molécules peuvent se transférer de l'énergie : ainsi l'excitation de la TRITC à une longueur
30 d'onde spécifique va être transférée à la FITC qui se trouve dans son voisinage - si l'appariement a eu lieu - et va alors émettre une fluorescence particulière. La méthode est sensible mais de nombreux paramètres doivent encore être
35 optimisés pour une utilisation courante (Davins et al., Analyt. Letters 20, 1397, 1987).

 Un nouveau système de dosage en chémoluminescence, commercialisé par la firme Boehringer Mannheim, se base sur la détection de sondes à DNA marquées à la digoxigénine et

détectés par des anticorps marqués dirigés contre la digoxigénine (Höltke H. and Kessler C. Nucleic Acids Research, 18 (19), 5843-51, 1990).

5 Cette molécule est reconnue par un anticorps couplé à la phosphatase alcaline qui réagissant avec un substrat, provoque l'émission d'un photon détectable.

Cette méthode assez sensible présente cependant l'inconvénient de faire intervenir une molécule toxique et d'être difficile à mettre en oeuvre.

10 La bioluminescence, a pour principe l'émission naturelle de photons provoquée par l'activité enzymatique des luciférases en présence de leurs substrats. Il existe deux types de luciférase, la luciférase utilisant l'ATP comme substrat et la luciférase qui utilise l'oxydation du NADH ou
15 du NADPH comme source d'énergie. Dans ce cas, la luciférase est associée à une NAD(P)H-FMN oxydoréductase.

Ces enzymes permettent la mesure de substrats en quantité très faible (10^{-12} moles). La luciférase à ATP a un rendement quantique 10 fois plus élevé que la luciférase à
20 NAD(P)H, ce qui permet un seuil de détection des substrats 10 fois plus bas. Suivant les conditions de dosage, le signal peut être stable pendant des temps très longs.

Différents procédés utilisant des agents de couplage tels que des billes d'agarose, du N-succinimidyl-3
25 (2-pyridylthio)propionate (SDPD), du glutaraldehyde (US.4.604.364) ont été proposés pour lier directement ces enzymes à des ligands tels que des anticorps, des antigènes ou des sondes nucléiques.

La demande de brevet EP 254172 décrit un conjugué
30 anticorps-enzyme (tel qu'une Beta-galactosidase) couplé par un réactif homobifonctionnel (le bis-maléimidopolyalkylène-glycol).

La demande EP 137515 décrit dans un test de bioluminescence, l'utilisation d'un conjugué immoglobuline
35 G - enzyme (aequorin).

Dans ces documents, ces deux conjugués sont obtenus par deux étapes d'activation successives de l'anticorps avec l'agent de couplage et de l'enzyme avec l'agent de couplage.

Cette double activation permet ensuite de faire réagir les deux composants activés entre eux et d'obtenir ainsi un conjugué.

Cependant, ces procédés de diagnostic sont basés
5 sur l'utilisation directe d'une luciférase, qui ne permet pas d'obtenir une sensibilité suffisamment élevée pour la détection et/ou le dosage de certains composés biologiques.

Aussi, d'autres procédés basés sur l'utilisation de kinases, ou de deshydrogénases conjugués à des ligands ont
10 été proposés.

La demande de brevet EP 304934 décrit des conjugués d'enzymes, en particulier de kinases, couplées à des ligands tels que des anticorps, des séquences nucléotidiques, de l'avidine ou de la streptavidine, de manière classique par
15 du glutaraldehyde suivant le procédé décrit par Avrameas et Al. (Bull. of Soc. Chim. Biol. (1968) 50, p. 1169).

Cependant l'utilisation des kinases et des deshydrogénases comme marqueurs a été limitée par leur inactivation due aux agents utilisés pour réaliser le
20 couplage de ces enzymes sur les différents ligands.

La demande de brevet EP 431882 décrit un réactif constitué d'une protéine telle qu'une enzyme (par exemple de la luciférase bactérienne ou une Beta-galactosidase) contenant un groupe thiol préactivé susceptible de fixer par
25 exemple une séquence nucléotidique.

Cependant, ce document ne décrit pas la fixation de ce conjugué préactivé à une kinase ou une deshydrogénase pour être utilisé dans un procédé de détection et/ou de dosage par bioluminescence.

Il est également connu par les demandes de brevets
30 EP 161138 et EP 302042 d'utiliser une glucose 6-phosphate deshydrogénase, fixée de manière covalente à un antigène ou anticorps, à une sonde nucléotidique ou bien à l'avidine pour la détection des sondes biotinylisées. Ce complexe permet de
35 révéler le NADH produit par la glucose 6-phosphate deshydrogénase, la luciférase, ou la FMN-oxydoréductase fixée de manière covalente sur le sépharose 4B.

Cependant, la sensibilité obtenue par ce procédé

est trop faible (sans doute en partie due aux phénomènes d'inactivation lors des couplages des enzymes décrits précédemment), pour détecter de manière optimale certaines séquences nucléotidiques d'organismes pathogènes ou non.

5 Buts de l'invention

L'invention consiste à fournir un nouveau conjugué et un nouveau procédé de préparation de ce conjugué, destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique; ledit conjugué étant constitué par un ligand susceptible de se lier de manière spécifique à un composé biologique et par une kinase ou une deshydrogénase qui après son couplage avec le ligand conserve son activité enzymatique.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un conjugué dont l'enzyme possède une activité spécifique, un "turn over rate" élevé, une stabilité élevée à température ambiante, de faible coût, facilement purifiable et dont la réaction est essentiellement irréversible.

Un but complémentaire de la présente invention consiste à fournir de nouvelles séquences d'acides nucléiques qui ont la propriété de s'apparier à des séquences complémentaires présentes dans le génome des virus responsables des papillomes humains (HPV) et qui puissent être utilisées en tant que ligand d'un conjugué selon l'invention ou être fixées à une molécule qui reconnaît un ligand d'un conjugué selon l'invention.

Un dernier but de la présente invention consiste à fournir une trousse de diagnostic comprenant le conjugué selon l'invention et qui présente une grande sensibilité de détection et/ou de dosage d'un composé biologique; cette sensibilité étant similaire ou plus élevée que pour les trousse de diagnostic de l'état de la technique.

Eléments caractéristiques de l'invention

L'invention concerne un conjugué actif destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique constitué par une kinase ou une deshydrogénase, dont les groupements soufres sont de préférence préalablement réduits, et capables de produire un composé intermédiaire utilisable par un système de bioluminescence, de préférence par une

luciférase; ladite kinase ou deshydrogénase étant couplée directement à un ligand, préalablement activé par un agent de couplage et susceptible de se lier directement ou indirectement (c'est-à-dire via une cascade de ligands
5 assurant une reconnaissance de type anticorps-anticorps, anticorps-antigène, staptavidine-biotine, etc), de manière spécifique audit composé biologique.

Selon l'invention, ladite kinase ou deshydrogénase, du conjugué, n'est pas préalablement activée et est couplée
10 directement à un ligand qui est lui-même préalablement activé par un agent de couplage.

On entend par composé biologique, tout microorganisme pathogène ou non pathogène, tel que les procaryotes, les eucaryotes, les mycoplasmes, les virus, les
15 lignées cellulaires végétales, ou animales, ...; les composants des dits microorganismes ou les composants produits par les dits microorganismes, en particulier les antigènes, les anticorps les séquences nucléotidiques, éventuellement préalablement amplifiées par une amplification
20 génétique (PCR ou LCR), les lipides, les saccharides, ... et/ou un mélange d'entre eux; de préférence fixés sur un support solide, un gel ou présent en solution.

Avantageusement, la kinase est une pyruvate kinase.

De préférence, l'agent de couplage est un agent
25 couplant hétérobifonctionnel tel que le N-Succinimidyl 3-2 pyridyldithio proprionate, le succinimidyl 4-(N maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate ou sont sulfo-dérivé.

Selon une forme d'exécution préférée de
30 l'invention, le ligand est choisi parmi le groupe constitué par les antigènes, les récepteurs d'hormones, les anticorps, les séquences nucléotidiques, les composés tels que l'avidine ou la streptavidine, capables de se fixer à des séquences nucléotidiques biotinylées et/ou un mélange d'entre eux.

35 Un autre aspect de la présente invention concerne des nouvelles séquences nucléotidiques ou des fragments de ces séquences d'ADN monocaténaire ou d'ARN, permettant la détection et/ou le dosage de divers virus responsables de

papillomes humains tels que le HPV-6B, le HPV-11, le HPV-16, le HPV-18 et le HPV-33.

La présente invention concerne en particulier :

- tout ou une partie d'une séquence d'ADN de 25 nucléotides:

5 la SEQ ID N°1 : TGTGCAACAA TGTGCAGACA TTATA.

- tout ou une partie de sa séquence complémentaire :

la SEQ ID N°2 : ACACGTTGTT ACACGTCTGT AATAT

- tout ou une partie des séquences d'ARN correspondantes aux séquences susmentionnées:

10 qui permettent la détection simultanée des 5 types de HPV susmentionnés.

Ces séquences s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 2047-2071 du gène E1 d'HPV6b avec deux mésappariements en position 9 et 15 et à une région

15 correspondant aux nucléotides 2047-2071 du gène E1 d'HPV11 avec deux mésappariements en position 8 et 9, à une région correspondant aux nucléotides 2076-2100 du gène E1 d'HPV16 avec un mésappariement en position 15, à une région correspondant aux nucléotides 2157-2171 du gène E1 d'HPV18
20 avec un mésappariement en position 6 et à une région correspondant aux nucléotides 2070-2094 du gène E1 d'HPV33 avec trois mésappariements en position 5, 8 et 15.

- tout ou une partie de deux séquences d'ADN de 25 nucléotides :

25 la SEQ ID N°3 : CCAAGGTTT AGATGCCTGC CAGGA

la SEQ ID N°4 : TACTACATAC ACCCCCGCAC AGACC

- tout ou une partie de leurs séquences complémentaires :

la SEQ ID N°5 : GGTTCGCAAA TCTACGCACG GTCCT

la SEQ ID N°6 : ATGATGTATG TGGGCGCGTG TGTGG

30 qui permettent la détection simultanée des HPV de types 6b et 11.

Les séquences 3, 3bis, 5 et 5bis s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 2736-2760 du gène E2 des HPV6b et 11, identiques pour les deux virus.

35 Les séquence 4, 4bis, 6 et 6bis s'hybrident à une région correspondant aux nucléotides 3355-3379 du gène E2 des HPV6b et 11, identique pour les deux virus.

- tout ou une partie d'une séquence d'ADN des 21 nucléotides:

la SEQ ID N°7 : ACCTTAACTG CAGATGTTAT G

- tout ou une partie de sa séquence complémentaire :

la SEQ ID N°8 : TGGAATTGAC GTCTACAATA C

qui permettent la détection simultanée des HPV de types 16,
5 18 et 33.

Ces séquences s'hybrident à une région
correspondant aux nucléotides 6780--6800 du gène L1 d'HPV16
avec un mésappariement en position 15, à une région
correspondant aux nucléotides 6759-6779 du gène L1 d'HPV18
10 avec un mésappariement en position 3 et à une région
correspondant aux nucléotides 6734-6754 du gène L1 d'HPV33
avec un mésappariement en position 15.

- tout ou une partie d'une séquence d'ADN de 25 nucléotides:

la SEQ ID N°9 : ATATCAGATC ACGAGAACGA AAATG

15 - tout ou une partie de sa séquence complémentaire :

la SEQ ID N°10 : TATAGTCTAC TGCTCTTGCT TTTAC

qui permettent la détection simultanée des HPV de types 16
et 18.

Ces séquences s'hybrident à une région
20 correspondant aux nucléotides 931-985 du gène E1 d'HPV16 et
à une région correspondant aux nucléotides 1007-1031 du gène
E1 d'HPV18 avec un mésappariement pour ce virus.

- tout ou une partie des séquences d'ARN correspondant aux
séquences susmentionnées :

25 la SEQ ID N°11 : UGUGCAACAA UGUGCAGACA UUAUA

la SEQ ID N°12 : ACACGUUGUU ACACGUCUGU AAUAU

la SEQ ID N°13 : CCAAGCCUUU AGAUGCGUGC CAGGA

la SEQ ID N°14 : UACUACAUAC ACCCCCGCAC AGACC

la SEQ ID N°15 : GGUUCGCAA UCUACGCACG GUCCU

30 la SEQ ID N°16 : AUGAUGUAUG UGGGGGCGUG UGUGG

la SEQ ID N°17 : ACCUUAACUG CAGAUGUUAU G

la SEQ ID N°18 : UGGAAUUGAC GUCUACAAUA C

la SEQ ID N°19 : AUAUCACAUG ACGAGAACGA AAAUG

la SEQ ID N°20 : UAUAGUCUAC UGCUCUUGCU UUUAC

35 Ces séquences ont la propriété de s'apparier à des
séquences complémentaires présentes dans le génome de divers
types de papillomavirus humains (HPV) et absentes dans le
génome humain.

Les hybrides ainsi éventuellement formés peuvent être détectés par des diverses méthodes de l'état de la technique telles que hybridation in situ, l'hybridation sur filtre, sur plastiques, en "sandwich", sur support solide, en solution, l'hybridation en Dot blot, Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non isotopique associé au fragment, par technique sondes froides, par amplification génétique, notamment par PCR ou LCR et/ou par bioluminescence.

Ces séquences mentionnées permettent l'identification spécifique des HPV les plus fréquemment rencontrés dans le tractus génital (types 6b, 11, 16, 18, 33). Il est connu que certains types de HPV (types 16, 18 et 33) sont plus fréquemment associés à l'apparition d'une tumeur maligne, en l'occurrence le cancer du col utérin chez la femme, alors que les autres types (6b et 11) sont caractéristiques de lésions bénignes. La détermination de la présence d'un ou de plusieurs HPV ainsi que du type HPV rencontré, est donc très importante pour l'établissement d'un pronostic et, par conséquent, d'une intervention thérapeutique éventuelle.

De préférence, tout ou une partie des séquences nucléotidiques susmentionnées, éventuellement biotinylées, sont comprises dans le ligand du conjugué selon l'invention ou sont susceptibles de se fixer à un conjugué selon l'invention, pour la détection et/ou le dosage des virus responsables de papillomes humains.

Un autre aspect de l'invention concerne le procédé de préparation du conjugué selon l'invention, dans lequel on fait réagir en solution un agent de couplage, de préférence hétérobifonctionnel, sur un ligand et dans lequel ce ligand activé est couplé à une kinase ou une déshydrogénase dont un ou plusieurs ponts sulfure ont été éventuellement réduits.

Avantageusement, la kinase ou la déshydrogénase du conjugué selon l'invention est immobilisée au niveau de son site actif sur une colonne d'affinité contenant un gel tel que le Blue Sépharose, ayant une affinité pour la kinase ou la déshydrogénase et est couplé au ligand préalablement

activé par l'agent de couplage, la colonne est lavée et le conjugué est élué par la colonne en modifiant la composition de la solution de lavage, par exemple en augmentant la force ionique.

5 Un autre aspect de l'invention concerne également l'utilisation du conjugué selon l'invention pour la détection et/ou le dosage d'un composé biologique; en particulier, l'application pour la détection et/ou le dosage par hybridation de séquences nucléotidiques; de préférence
10 détectées par un procédé choisi parmi le groupe constitué par l'hybridation in situ, l'hybridation sur filtre, sur plastique, sur support solide, en solution, en "sandwich", sur gel, l'hybridation en Dot blot, en Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non-isotopique associé
15 au fragment, par technique sondes froides, par amplification génétique, notamment par PCR ou LCR et/ou par un mélange d'entre eux.

Un dernier aspect de l'invention concerne la trousse de détection et/ou de dosage d'un composé biologique
20 comprenant le conjugué selon l'invention et éventuellement les réactifs destinés à la détection et/ou au dosage de séquence nucléotidiques, par un procédé choisi parmi le groupe constitué par l'hybridation in situ, l'hybridation sur filtre, sur plastique, sur support solide, en solution, en
25 "sandwich", sur gel, l'hybridation en Dot blot, en Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non-isotopique associé au fragment, par technique sondes froides, par amplification génétique, notamment par PCR ou LCR et/ou un mélange d'entre eux.

30 Brève description des figures

La figure 1 représente de manière schématique l'application du conjugué selon l'invention dans un dosage par hybridation de séquences oligonucléotidiques.

35 Les figures 2 à 4 représentent des variantes d'exécutions du dosage représenté à la figure 1.

Les figures 5 et 6 représentent respectivement une mesure directe et indirecte du DNA d'un virus HPV par le conjugué selon l'invention.

La figure 7 représente l'effet de la concentration en SPDP sur l'activité de la pyruvate kinase et sur le nombre de bras fixés par molécule d'enzyme.

La figure 8 représente une mesure par bioluminescence avec le conjugué selon l'invention d'IgG humains.

La figure 9 représente une courbe de concentration d'une séquence cible HIV par le conjugué selon l'invention.

Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention

Dans la présente invention, on utilise comme agent révélateur, la luciférase à ATP plutôt que la luciférase à NADH, du fait de sa plus grande sensibilité de dosage des substrats. Afin d'augmenter encore la sensibilité et d'obtenir un signal important sur une longue période de temps, on marque la séquence nucléotidique, l'anticorps, l'antigène, l'avidine ou la streptavidine avec une kinase qui peut produire une quantité constante d'ATP suivant les conditions expérimentales. Cet ATP est ensuite dégradé par la luciférase et l'activité de cette dernière est quantifiée par la détection des photons émis.

Le choix d'une kinase

L'enzyme marqueur doit être choisi en fonction de différents critères qui sont semblables à ceux utilisés pour les ELISA (Avrameas, Scand. J. Immunol., 8, 7-22, 1978), à savoir:

- une activité spécifique et un "turn over rate" élevés ;
- une stabilité relativement bonne à température ambiante ;
- une perte d'activité, suite au couplage, qui doit être la plus faible possible, et enfin,
- l'enzyme doit être disponible sous forme hautement purifiée, soit commercialement, soit sa préparation doit être relativement simple,
- de plus, l'enzyme doit être choisi en fonction de la stabilité de ses substrats.

D'après Kayne (Kayne F.S., The Enzyme, ed Boyer part. A, 8, 1973, Academic Press, pp. 353-382), la pyruvate kinase est commercialement disponible sous forme très pure mais il est aussi très simple d'en purifier de grandes

quantités à partir de muscles de lapin. D'autre part, la réaction catalysée par la kinase est essentiellement irréversible en faveur de la formation de pyruvate et d'ATP car la variation d'énergie libre standard de la réaction est
5 de - 7,5 kcal/mole (Muirhead, M., Biochemical Society Transactions, 15 (5), 996-999, 1987).

Phosphoenolpyruvate + ADP ----- > Pyruvate + ATP

Une solution d'enzyme à 5 mg/ml garde son activité au moins 48 h à température ambiante. La solution
10 commerciale (avec 50% de glycérol) est stable au moins 6 mois à 4°C.

En outre, la pyruvate kinase présente d'autres avantages, tels que sa disponibilité commerciale, sa bonne stabilité thermique et le déplacement de la réaction dans le
15 sens de la formation de l'ATP.

De plus grâce à des manipulations génétiques, de nouvelles kinases ayant des propriétés particulières peuvent être produites. Ainsi, on peut produire une pyruvate kinase thermostable grâce au clivage d'une partie de sa séquence.
20 Celle-ci peut alors être utilisée à haute température lors des réactions d'hybridation (Walker et Al. Journal of Molecular Biology (1992) 228, p. 265-276).

De même, d'autres kinases, comme l'acétate kinase peuvent être utilisées.

25 Couplage de la pyruvate kinase

L'utilisation des agents de couplage habituels (glutaraldehyde, SPDP(N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate), periodate, ...) conduit effectivement à la formation de conjugués pour lesquels la perte d'activité est
30 très élevée et dépasse les 95%. Ceci confirme la sensibilité des kinases et déshydrogénases aux agents de couplage et le fait que l'utilisation des méthodes de couplage habituelles ne permet pas d'obtenir des conjugués suffisamment actifs pour une utilisation dans les tests diagnostiques.

35 Lors d'expériences contrôles, les inventeurs ont constaté avec surprise que la kinase native non activée pouvait se fixer de manière covalente sur les ligands activés au SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate).

L'explication de cette observation inattendue est probablement que la kinase porte un groupement -SH libre qui peut réaliser un pont disulfure avec le groupement 2 pyridyl-disulfure fixé sur la sonde activée. Le conjugué obtenu par
5 cette approche est tout à fait actif.

Les inventeurs ont aussi constaté que l'on peut avantageusement augmenter le rendement du couplage par réduction préalable d'un ou plusieurs ponts disulfures naturels de la kinase par de faibles concentrations en
10 dithiothréitol et cela, sans perte d'activité.

Les conditions de couplage optimisées en solution sont décrites ci-après pour les anticorps. Les inventeurs ont observé qu'une activation des anticorps avec un excès molaire de 5 SPDP produisait la fixation de 1 à 2 bras SPDP par
15 molécule d'anticorps. Cette concentration en SPDP donne un maximum de conjugués actifs lorsqu'on met en présence une quantité équivalente (en mole) d'anticorps activés et de kinase.

Une autre méthode de couplage sur colonne (phase
20 solide) qui permet d'améliorer le rendement, de faciliter la séparation entre les anticorps conjugués à la kinase et les anticorps non conjugués et de pouvoir préparer une grosse quantité de conjugués, consiste à fixer par des liaisons faibles non covalentes la kinase au niveau de son site actif
25 sur une colonne contenant du Blue Sépharose (Pharmacia, Uppsala, Suède) puis de faire circuler sur la colonne en circuit fermé et pendant un temps suffisant (habituellement 16h) les anticorps préalablement activés au SPDP.

Les anticorps activés auront ainsi tout le loisir
30 de réaliser des conjugués avec la kinase immobilisée sur le Blue Sepharose.

Après la réaction, la colonne est lavée et les anticorps qui n'ont pas réagi sont éliminés, puis le conjugué est élué en augmentant la force ionique de la solution de
35 lavage. Cette méthode est décrite en détail ci-après pour les anticorps et pour l'avidine.

La disponibilité de conjugués actifs permet leur utilisation pour des tests diagnostiques basés soit sur des

réactions immunologiques telles que les procédés Enzyme linked ImmunoSorbent Assays ou ELISA ou sur l'hybridation de séquences nucléotidiques.

Le principe de la méthode de couplage de la kinase sur les anticorps a pu être étendue à d'autres protéines et même à des oligonucléotides. Ainsi l'avidine et la streptavidine ont pu être activées avec le SPDP puis après élimination du réactif en excès, mis en présence de pyruvate kinase. Le conjugué ainsi formé en solution a été purifié sur une colonne de Blue Sepharose qui retient la kinase et s'est révélé extrêmement actif.

Pour la fixation de sondes d'oligonucléotides sur la kinase, les sondes à ADN peuvent être terminées par une amine en position 3' et/ou 5' terminal, qui peuvent être incorporés soit au cours de la synthèse de la chaîne nucléotidique réalisée ou ajoutées par la suite.

Cette amine terminal est alors activée par le SMCC puis après élimination des réactifs en excès mis en présence de pyruvate kinase pour le couplage. Le conjugué est alors facilement purifié par chromatographie moléculaire ou d'affinité.

Dosages immuno-enzymatiques (ELISA)

La kinase peut être couplée à un anticorps pour former un conjugué anticorps-kinase qui peut servir dans les divers tests ELISA.

Dans le cas d'un dosage direct des conjugués, on utilise une boîte multipuits ou des tubes ou un support quelconque sur lesquels sont immobilisés les antigènes.

Les conjugués anticorps-kinase sont alors ajoutés en quantité décroissante. Après lavage, l'activité de la kinase fixée est mesurée en présence de ses substrats, permettant de produire de l'ATP, qui en présence de luciférine est dégradé par la luciférase avec une émission de lumière. Celle-ci peut être mesurée par un bioluminomètre ou par un film sensible comme un "Polaroid" (R) ou encore par un papier négatif sensible aux rayons X. Ce test permet de déterminer le titre des anticorps.

Dans les conditions de dosage de la pyruvate

kinase, l'excès de substrats par rapport à la quantité d'enzymes et à la quantité de luciférases est tel que ces enzymes travaillent pendant plusieurs jours. On peut suivre l'émission de lumière pendant trois jours dans un test ELISA normal.

Le test direct permet la mesure de l'antigène grâce à l'utilisation de la méthode dite compétitive. Dans ce cas, l'anticorps est immobilisé sur la boîte ou le support de dosage. Ensuite, l'antigène à doser est incubé en présence d'une quantité fixe d'antigène conjugué à la kinase. Ces deux antigènes vont entrer en compétition pour l'anticorps fixé sur la boîte : plus l'antigène à doser sera en quantité importante, moins l'antigène-kinase pourra se fixer sur l'anticorps. C'est celui-ci qui est détecté par l'activité de la kinase. L'estimation de l'antigène à doser se fait alors en référence à une courbe d'étalonnage.

Le dosage de l'antigène se fait plus facilement grâce à la méthode dite en Sandwich. La boîte ou le support solide contient des anticorps immobilisés. L'antigène à doser est alors ajouté en dilutions croissantes puis après lavage, une quantité fixe d'un second anticorps marqué à la kinase est ajouté et l'activité de la kinase est mesurée. Une variante à cette méthode consiste à utiliser un second anticorps non marqué et d'ajouter par la suite un anti-anticorps marqué à la kinase (Double Sandwich).

Le dosage en Sandwich permet également la mesure d'anticorps et dans ce cas on utilise un support sur lequel l'antigène est immobilisé. L'anticorps est ajouté en concentrations croissantes puis après lavage, des anti-anticorps marqués à la kinase sont incubés et l'activité de la kinase est mesurée. Ici aussi, on peut réaliser des doubles Sandwich en utilisant un anti-anticorps non marqué puis un deuxième anti-anticorps conjugué à la kinase.

Dosage par hybridation de séquences oligonucléotidiques

La possibilité d'utiliser l'avidine (ou la streptavidine), les anticorps ou des nucléotides comme sondes qui peuvent être couplés à la kinase, permet la mise au point de tests de reconnaissance de séquences nucléotidiques. Cette

technique peut s'appliquer à un très grand nombre de domaines comme les tests diagnostics de détection de bactéries, de champignons, de levures, de virus, de cellules cancéreuses ou de tout organisme biologique possédant une séquence
5 d'acides nucléiques particulière.

Le principe de l'hybridation d'oligonucléotides est bien connu et nous le reprendrons brièvement. Il s'agit, de la reconnaissance d'une séquence de nucléotides (ADN ou ARN) par un brin de nucléotides complémentaire et de leur
10 appariement en une double chaîne dans des conditions de température, pH et sels adéquats. Cette reconnaissance est permise par la formation de ponts hydrogène entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou uracile (U)) et entre la guanine (g) et la cytosine (C). Si l'on connaît la séquence de ADN
15 (ou de RNA) à détecter, il est possible de construire par des procédés chimiques, enzymatiques, ou biologiques la séquence complémentaire qui ira s'hybrider de manière spécifique avec le DNA (ou le RNA) à détecter.

De préférence, cette hybridation s'effectue dans
20 des conditions stringentes, de manière à assurer une hybridation spécifique et éviter ainsi des faux positifs.

L'utilisation des conjugués kinase selon l'invention pour réaliser des tests en bioluminescence a comme avantage une sensibilité très grande et une mesure de
25 détection pouvant s'étendre sur plusieurs jours. Dans le procédé le plus simple, la séquence de nucléotides utilisée pour le test est marquée à la biotine. Ce marquage peut se faire de diverses manières :

- soit chimiquement en utilisant un oligonucléotide biotinylé
30 lors de la synthèse, ou en faisant réagir la séquence avec un NHS-biotine, biotényl aminocapric acid-N-hydroxysuccinimide ester, ou un réactif portant la biotine et susceptible de se fixer sur la séquence nucléotidique,
- soit de façon enzymatique en utilisant la terminal
35 transferase qui incorpore les nucléotides biotinylés à l'extrémité d'une séquence nucléotidique spécifique. La biotine peut être incorporé dans les acides nucléiques grâce à un composé photoactivable appelé photobiotine.

La séquence biotinylée peut alors être reconnue par l'avidine ou la streptavidine elle-même couplée à l'enzyme ou après réaction avec un anticorps marqué à la kinase et dirigé contre la séquence biotinylée. Après hybridation avec la séquence à détecter, un conjugué avidine-kinase est utilisé, qui se fixe sur la biotine. L'activité de la kinase est alors mesurée par sa production d'ATP qui en présence de luciférase émet des photons.

La détection de séquence de l'ADN ou RNA présent en solution est plus complexe car elle nécessite une étape d'immobilisation afin de réaliser un lavage ou une réaction de compétition. Elles peuvent être immobilisées directement sur des filtres de nitrocellulose ou de nylon dans des tests dits de "Dot Blot" ou après séparation par électrophorèse sur gels (Southern blot et Northern blot).

Dans le cas où le DNA 1 (ou RNA) à mesurer se trouve en quantité très faible, on peut aussi immobiliser ce DNA 1 grâce à une séquence complémentaire 2 qui est elle-même immobilisée sur un support 3 (filtre, gel, plastique, verre, billes...). Le DNA 1 (ou RNA) hybridé sur la sonde immobilisée, pourra être mesuré à l'aide d'une autre séquence 4 biotinylée et d'un conjugué avidine-kinase 5 ou d'un anticorps kinase anti-sonde. Cette méthode utilisant deux séquences nucléotidiques (2 et 4), - l'une immobilisée dite capteur 2 et l'autre biotinylée dite détecteur 4 - est aussi appelée méthode Sandwich. Du point de vue de la méthodologie, les deux séquences capteur et détecteur peuvent être ajoutées simultanément au DNA (ou RNA) à détecter ou de manière séquentielle suivant les conditions du test et du résultat à obtenir : sensibilité plus grande, rapidité de travail ou facilité des manipulations (figure 1).

Ces méthodes peuvent être complexifiées en utilisant non seulement la reconnaissance entre l'avidine et la biotine mais aussi entre les antigènes (ou haptènes) et les anticorps (figures 2, 3 et 4).

Par exemple, on peut utiliser une séquence d'acides nucléiques biotinylée 4 puis une réaction avec de l'avidine 6, couplée ou non à la kinase, qui sera elle-même reconnue

par des anticorps anti-avidine 7 couplés à la kinase (figures 2 et 3).

On peut aussi faire réagir directement (figure 4) des anticorps 8 couplés ou non à la kinase et dirigé contre la biotine qui est fixée sur la sonde. Une autre molécule que la biotine, par exemple la fluoresceïne ou la digoxigénine qui peuvent être reconnues par des anticorps spécifiques, peuvent servir à marquer la sonde.

Il existe plusieurs variantes à cette technique comme l'utilisation d'un deuxième anticorps conjugué à la kinase ou l'utilisation d'anticorps conjugué à la biotine sur lesquels on peut faire réagir des conjugués avidine-kinase. Quelle que soit la combinaison utilisée, on utilisera au moins un conjugué avidine-kinase 5 ou anticorps-kinase 7 selon l'invention dans l'une des étapes de la réaction.

Ces reconnaissances spécifiques avidine-biotine ou anticorps-antigène peuvent aussi être mises à profit pour l'immobilisation sur le support solide. Ceci permet de faire la réaction d'hybridation en solution avant de réaliser l'immobilisation. L'avantage de l'hybridation en solution réside en sa plus grande rapidité par rapport à l'hybridation sur support solide pour laquelle les facteurs stériques et de diffusion ralentissent la réaction.

Un procédé particulièrement avantageux consiste à réaliser l'hybridation de l'ADN à mesurer avec deux séquences nucléotidiques complémentaires d'une partie de l'ADN à mesurer. Ces deux séquences sont marquées par des molécules différentes, par exemple l'une par la biotine et l'autre par la kinase. Après hybridation, l'ensemble est mis en présence d'un support portant de l'avidine qui va fixer les séquences biotinylées dont certaines feront partie de l'hybride, qui portera une deuxième séquence-kinase qu'il suffira de mesurer en présence de luciférase et des substrats appropriés.

L'immobilisation peut se réaliser grâce à l'utilisation de séquences primers complémentaires comme des poly C ou poly A qui reconnaissent respectivement des séquences poly G ou poly T (poly U).

La sonde portant la biotine ou une deuxième sonde

spécifique DNA ou RNA à doser, peut porter une séquence poly A (ou poly T ou poly G) qui pendant l'hybridation en solution se fixera sur la séquence complémentaire fixée à un support.

Les deux séquences peuvent aussi porter une biotine
5 ou un antigène (ou haptène) comme du dinitrophénol ou de la fluorescéine.

Après hybridation, on peut soit immobiliser l'hybride sur un support portant l'avidine et révéler l'hybride par un anticorps dirigé contre l'antigène ou
10 l'haptène (ici, anti-dinitrophénol ou anti-digoxigenine) marqué à la kinase. Si l'anticorps n'est pas marqué à la kinase, un deuxième anti-anticorps marqué à la kinase peut être utilisé.

L'immobilisation peut aussi se faire à partir
15 d'anticorps fixés sur le support qui va reconnaître et fixer l'antigène ou l'haptène (ici le dinitrophénol). La révélation de l'hybride se fera alors en faisant réagir de l'avidine-kinase sur la séquence biotinylée de l'hybride. Les autres méthodes de mise en évidence de la biotine-avidine expliquées
20 ci-dessus peuvent aussi servir mais dans tous les cas, un conjugué-kinase au moins sera utilisé.

On peut aussi coupler la kinase à des anticorps reconnaissant les doubles brins de DNA.

Dans ces situations de détection des hybrides
25 décrites ci-dessus, on faisait appel, dans une des étapes au moins, à la reconnaissance entre la biotine et l'avidine ou des anticorps et leur antigènes ou haptènes.

On peut éviter le passage par cette réaction dans le cas notamment de la pyruvate kinase (on a observé que
30 cette enzyme était stable à 45°C pendant 2h au moins, ce qui représente des conditions d'hybridation que l'on peut obtenir notamment avec des oligonucléotides). Sur base de ces observations, on réalise un conjugué composé de kinase directement couplée sur la séquence d'oligonucléotides qui
35 servira à l'hybridation; l'activité de la kinase étant mesurée en présence de ses substrats et de luciférase.

Cette technique peut être appliquée après amplification d'une séquence par PCR en solution ou même

dans une cellule fixée. Dans ce cas, le procédé utilisant une pyruvate kinase thermostable est particulièrement bien adapté.

EXEMPLES

5 TESTS IMMUNOLOGIQUES

I- Mise en évidence de conjugués anti-IgG-kinase.

Des IgG de souris sont immobilisés sur des plaques multipuits. Les puits sont alors saturés par l'albumine bovine pendant 4 h. Ensuite, les puits sont lavés 3 fois
10 avec une solution de Tween. Les puits peuvent éventuellement être séchés. Les anticorps conjugués sont alors incubés en présence d'albumine pendant 2 h à 20°C. Après lavage : l'activité de la kinase est dosée en ajoutant une solution mélange contenant ces substrats à savoir : du
15 phosphénolpyruvate, de l'ADP, la luciférine, la luciférase ces deux derniers étant destinées à la détection de l'ATP produit à partir de l'ADP et du phosphoénolpyruvate par la kinase. La mesure des photons se fait dans un bioluminomètre au cours des 5 minutes qui suivent, et le résultat est
20 exprimé en fonction de plateau ou de l'intégration pendant 1 minute. On peut aussi exposer à l'aide d'un film polaroid sensible, par exemple 3.000 ou 20.000 ASA pendant 5 minutes suivi d'un développement de 45 sec. Dans un test réalisé de cette manière, les anti-IgG-kinase ont été dilués
25 successivement et ont pu être détectés jusqu'à une dilution de 2.560 fois, ce qui représentait $2,6 \cdot 10^{-13}$ moles d'anticorps par test.

II- Mesure d'IgG considérés comme antigènes (méthode Sandwich).

30 La même expérience fut réalisée comme au point précédent mais en immobilisant sur les plaques multipuits des anticorps de lapins anti-IgG humains. Ces plaques ont été incubées avec des IgG humaines à des dilutions de plus en plus grandes, ensuite ont été lavées, puis des anticorps de
35 souris anti-IgG-humaine conjugués à la kinase ont été ajoutés à tous les puits. La mesure de la kinase par la plaque photographique a permis de détecter une concentration de $8,3 \cdot 10^{-14}$ mole/test d'IgG humaine.

III- Détermination du titre des anticorps anti-Beta-HCG (human corionic gonadotropin).

On réalise deux dilutions de 20X et de 100X d'un sérum positif anti-Beta-HCG contenant 98.000 mUI/ml avec du sérum négatif (provenant d'un sujet humain de sexe féminin). Ces deux dilutions ont été incubées pendant 60 minutes à 37°C et sous atmosphère humide dans 2 X 3 séries de micropuits préalablement coatés avec l'anticorps monoclonal trappeur (anti-Beta HCG). Après trois rinçages, on incube une préparation commerciale d'IgG polyclonales de lapin anti-HCG, dialysée et diluée 100 X, 1.000 X et 10.000X. On rince trois fois dans le tampon phosphate. Enfin, pour chaque série de micropuits, nous avons réalisé une courbe de concentration en conjugués qui sont composés d'un anticorps de mouton anti-IgG de lapin conjugués à la pyruvate kinase. Après trois rinçages, on dose l'activité au moyen du lecteur de plaques en bioluminescence. Si on dilue l'anticorps de lapin anti-HCG 100X et si on utilise une dilution de 50 fois pour le conjugué, on observe une activité de 30 RLU pour la dilution 20X du sérum HCG à 98.000 mUI/ml, et de 7 RLU (valeur du test moins la valeur du blanc) pour la dilution 100X. On peut donc doser des concentrations de 4.900 mUI/ml de BetaHCG dans le sérum avec un rapport signal/bruit de 7 et une concentration de 980 mUI/l avec un rapport signal/bruit de 2. Cette valeur constituerait, dans l'état actuel des choses, la limite de détection du dosage. Un sérum est considéré comme positif lorsqu'il contient plus de 2.000 mUI/l ce qui cadre bien avec les exigences requises en laboratoire de biologie clinique. Une optimisation des conditions permettrait d'améliorer encore les performances de ce dosage.

IV- Dosage des anticorps anti-histone.

Un dosage d'anticorps anti-histone dans le sérum d'un patient positif a été réalisé en diluant le sérum de 2 en 2 fois par un sérum contrôle pour les dilutions allant de 800 à 102.400 fois. Les boîtes multipuits ont été coatées avec des protéines histones. Le sérum humain anti-histone a été incubé dans ces puits, puis après lavage un anticorps

de lapin anti-IgG humain marqué à la kinase. Ce sérum anti-histone donnait un signal linéaire en fonction de la dilution jusqu'à une dilution de 25.600 fois alors que le même test réalisé avec un conjugué marqué à la peroxydase et
5 révélé en spectrophotométrie suivant les conditions habituelles du fabricant (Biolal, Belgique) en utilisant l'ABTS (azino-benzthiazoline sulfonate) comme substrat ne détectait que jusqu'à la dilution de 1.600 fois.

Tests génétiques

10 I. Mesure directe du DNA du virus HPV-18

A. Fixation covalente du DNA sur les boîtes plastiques

Le DNA du virus d'HPV-18 a été immobilisé de manière covalente sur des boîtes de plastique multipuits modifiées de manière à ce qu'elles présentent des groupements
15 aminés en surface. La fixation se fait entre le phosphate 5' terminal de l'ADN et la fonction amine greffée sur le plastique, via les agents couplants que sont l'1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide et le méthylimidazole.

20 Les plaques sont incubées 5 h à 50°C, puis les puits sont lavés par une solution 5 x SSC contenant 0,25% de SDS et à 50°C. Ces conditions de fixation sont recommandées par la firme qui commercialise ces boîtes Covalink. (NUNC, Gibco BRL)

25 B. Révélation du DNA par des oligo-biotinylés

Un oligonucléotide de 21 paires de base a été sélectionné pour sa spécificité à reconnaître une séquence spécifique des DNA viraux de HPV 18 - 33 et 16. Il s'agit de la séquence :

30 5'- A C T T T A A C T G C A G A T G T T A T G -3'

Cette séquence s'hybride à une région correspondant aux nucléotides 6780-6800 du gène L1 HPV16 avec un mésappariement en position 15 et un en position 3, à une région correspondant aux nucléotides 6759-6779 du gène L1 d'HPV18
35 et à une région correspondant aux nucléotides 6734-6754 du gène L1 d'HPV 33 avec un mésappariement en position 15 et un mésappariement en position 3.

Le marquage à la biotine de cet oligonucléotide se

fait au moyen de la terminal transferase. Celle-ci fixe à l'extrémité 3' quelques d.UTP biotinylés et quelques d-CTP (non biotinylés).

L'hybridation se déroule dans les puits où l'ADN à été fixé, dans une solution d'hybridation comprenant l'oligo biotinylé et l'on incube 16h à 50°C.

Après lavage, le conjugué avidine-kinase est alors ajouté à raison de 0,01 mg/ml et après lavage, l'activité de la kinase est révélée en présence de ses substrats et de la luciférase comme explicitée dans les exemples ci-dessus. La quantité de DNA viral de HPV-18 mise en évidence dans ces conditions correspond à la solution de 100 ng/puits, ce qui est très élevé.

II- Mesure indirecte du DNA du virus HPV-18 (Méthode Sandwich) par deux oligonucléotides

A. Génome de 586 BP

Pour éviter les problèmes de viscosités, d'interactions, d'encombrements qu'impliquent la manipulation du génome complet d'HPV (+/- 8 000 bp), on amplifie par PCR une partie de ce génome, à savoir, un brin de 586 bp à partir de la 6193e base jusqu'à la 6.779e base.

B. Fixation covalente de l'oligo-trappeur

L'oligonucléotide trappeur de 21 paires de bases a une spécificité unique pour le génome d'HPV 18 et constitue le complémentaire des 21 premières bases à partir de l'extrémité 3' du fragment sélectionné ci-dessus.

La séquence est 5'-T T T T C G A A G A T G G T G A T A T G G- 3'

L'oligo-trappeur est immobilisé de manière covalente dans les boîtes NUNC de la même manière que précédemment pour le DNA du virus HPV 18.

On incube durant 5h à 50°C, 5 ng d'oligonucléotides par puits et fixons environ 1,2 ng par un lien covalent.

C. Hybridation du fragment d'HPV 18

Pour l'hybridation, les puits contenant l'oligonucléotide trappeur sont d'abord rincés.

On ajoute alors à 200 microl/puits de la solution d'hybridation contenant des concentrations décroissantes du

fragment du génome d'HPV 18 diluée dans l'eau et dénaturé. L'hybridation se déroule à 50°C pendant 2 h.

D. Hybridation de l'oligonucléotides biotinylé

L'oligonucléotide détecteur de 21 paires de bases est spécifique pour les génomes d'HPV 16, 18 et 33 (cfr. mesure indirecte du virus HPV 18 - point B) et constitue le complémentaire des 21 dernières bases à partir de l'extrémité 3' du fragment de 586 paires de bases sélectionné au point A. Sa séquence:

10 5'-A C T T T A A C T G C A G A T G T T A T G-3'

Après avoir lavé les puits, nous procédons, à une nouvelle hybridation de la même manière que précédemment sinon que l'on ajoute à la solution d'hybridation les oligonucléotides biotinylés. Cette hybridation dure 1 h à 15 50°C.

E. Révélation par bioluminescence

Après hybridation, les plaques sont lavées, puis le conjugué avidine-kinase est ajouté à raison à 0,01 mg/ml et après lavage, l'activité de la kinase est révélée en 20 présence de ses substrats et de la luciférase, comme explicitée dans les exemples ci-dessus.

III. Mesure indirecte du DNA de virus HPV (méthode sandwich en présence de chaîne d'ADN par double reconnaissance de sondes plus longues et détection par l'intermédiaire d'anticorps marqués à la kinase)

A. Génome de 586bp

Pour éviter les problèmes de viscosité d'interactions d'encombrement qu'implique la manipulation de génome complet d'HPV, on amplifie par PCR une partie du 30 génome, à savoir un brin de 586bp à partir de la 6193ème base jusqu'à la 6779ème base.

B. Fixation covalente d'une sonde trappeur

Une sonde trappeur fabriquée par PCR et phosphorylée en 5' est fixée dans les puits de façon 35 covalente comme préalablement.

C Hybridation sandwich

Une sonde de détection biotinylée à été produite par PCR. La biotine est incorporée grâce à la présence de

dUTP biotinylé en rapport 1/2 avec le dTTP.

L'hybridation se fait dans les puits où la sonde trappeur est immobilisée. La solution d'hybridation comprend l'ADN cible de HPV de 586bp et la sonde biotinylée par PCR.

5 L'hybridation se fait à 70°C pendant 2 heures.

D. Révélation

Après lavage et saturation, l'avidine est incubée dans les puits, puis l'anticorps anti-avidine suivi du l'anticorps dirigé contre ce dernier et marqué à la kinase.

10 Après lavage et équilibration, l'activité de la kinase est révélée en présence de ses substrats et du système luciférase comme explicité ci-dessus et on mesure la production de lumière au luminoskan ou on prend une photo Polaroid.

E. Résultats

15 La mesure de la lumière était de 10000 RLU (Relative light unit) sur le bioluminomètre Lumac pour 500pg de DNA cible de HPV et de 2500 RLU pour 50pg de DNA cible de HPV.

20 IV. Mesure indirecte du DNA de virus HPV (méthode sandwich en présence de chaîne d'ADN et révélation par un conjugué streptavidine Kinase)

La préparation des sondes trappeurs fixées dans les puits en plastique et des sondes détectrices marquées à la biotine est identique que dans l'exemple III ci-dessus.

25 L'hybridation est réalisée dans les mêmes conditions. Après hybridation, on lave et on sature les puits avant d'incuber le conjugué streptavidine Kinase dilué 1000X. Les puits sont lavés 4 fois avant d'être incubés en présence des substrats de la kinase et la luciférase comme dans les
30 exemples précédents. Dans ces conditions, une courbe de concentration a été réalisée de 500pg à 5pg en DNA cible de HPV et les valeurs de RLU sont supérieures aux contrôles réalisés en présence de DNA non spécifique.

35 V. Mesure indirecte du DNA de virus HIV (méthode sandwich en présence de chaîne d'ADN et révélation par un conjugué streptavidine Kinase).

A. Cible produit par PCR.

Un segment de la chaîne de RNA du virus du sida

(HIV-I) a été transcript en DNA puis amplifié par PCR. Ce fragment comprend 473bases situé entre la 1214ème base et la 1687ème.

B. Hybridation

5 La préparation des sondes trappeurs et détectrices ainsi que l'hybridation et la révélation se font de la même façon que dans le cas VIII.

C. Résultats

10 Une courbe de concentration en fragments de DNA cible de HIV a été réalisée allant de 1000 à 1pg. Pour chacune de ces concentrations la mesure de RLU était significativement supérieure aux contrôles réalisés avec du DNA non spécifique (résultats présentés à la figure 9).

VI. Mesure indirecte de DNA de virus cytomégalovirus

15 Un segment de la chaîne de RNA du virus de CMV a été transcript en DNA puis amplifié par PCR. Ce fragment de 434bases est situé entre la 2223ème base et la 2657ème base.

Le protocole expérimental fut réalisé comme pour l'exemple VIII et on a obtenu une courbe de concentration en
20 DNA cible de CMV allant de 1000 à 10pg.

VII. Mesure indirecte de DNA de la bactérie Chlamydia trachomatis

25 Un segment de DNA de chlamydia trachomatis a été amplifié par PCR. Ce fragment de 415bases est situé après la 5339ème base et constitue le DNA cible.

Le protocole expérimental fut réalisé comme pour l'exemple VIII et on a obtenu une courbe de concentration en DNA cible de Chlamydia trachomatis allant de 2000 à 20pg.

VIII. Elisa en bioluminescence avec lecture sur plaque

30 Polaroid

De nouveaux conjugués sont synthétisés, des plaques 96 puits sont coatées avec des IgG de lapin anti-IgG humains, des IgG humains et des IgG de souris.

a/La première opération consiste à réaliser une
35 courbe de saturation afin de déterminer le titre des conjugués;

b/Le dosage Elisa proprement dit a été réalisé suivant deux méthodes qui varient légèrement au niveau du

dosage de l'enzyme marqueur. Dans un premier cas, mesure directe, on mesure continuellement l'ATP produit par la réaction de la pyruvate kinase en bioluminescence. Cette méthode permet de détecter $2.6 \cdot 10^{-13}$ mol/test d'IgG humains (fig 5). Dans un deuxième cas, mesure indirecte, l'ATP produit est accumulé pendant 60 minutes puis mesuré en bioluminescence. Dans ce cas, on détecte $8.32 \cdot 10^{-14}$ mol/test (fig.6). On constate que la sensibilité n'a pas été améliorée comme on aurait pu l'espérer.

10 IX. Effet de la concentration en SPDP sur le nombre de bras fixés et sur l'activité de la pyruvate kinase, protection par les substrats

Des aliquots de 100ml de pK à 10mg/ml dans du KH_2PO_4 100mM pH7 sont activés avec 200 ml de SPDP en concentration croissante dans de l'éthanol. Après 30 minutes de réaction, le SPDP en excès est éliminé sur Sephadex G25 et la PK est analysée par rapport à son activité résiduelle et au nombre de bras fixés par molécule d'enzyme. L'expérience est aussi réalisée en présence de substrats en concentration 1mM (ADP phosphoénolpyruvate et MgCl_2). Le graphique montre que pour un faible nombre de bras fixés sur l'enzyme (inférieur à 5), l'activité résiduelle est semblable si l'expérience est effectuée en présence de substrats ou non. Au delà d'un excès de 10 SPDP, ce qui correspond à ± 4 bras fixés par enzyme, l'activité résiduelle est légèrement supérieure si l'expérience en présence des substrats (fig.7).

Dans une boîte micropuits, des immunoglobines (IgG) de souris (blanc) et humains (test) sont coatées selon une méthode classique. Après une incubation avec des conjugués IgG anti-IgG humains couplés à la pyruvate kinase, les micropuits sont lavés et on révèle en luminescence. L'activité de la kinase couplée à l'IgG anti-IgG humain. Ces derniers se fixent dans les puits contenant leur antigène, à savoir les IgG humains. (fig.8).

35 X. Mesure de fragment de DNA produits à partir du RNA de virus HIV

Dans une boîte Covalink (NUNC) de micropuits, des sondes à DNA spécifiques du virus HIV ont été fixées de

manière covalente par leur extrémité 5' puis incubées en présence de fragments de DNA provenant d'une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'un fragment 475bp correspondant à une partie du RNA du virus du SIDA (HIV-I).

- 5 Les solutions contenant également une sonde détectrice de 205bp biotinylée et aussi complémentaire de la séquence d'ADN du virus HIV-I.

Après hybridation à 70°C et lavage, un conjugué streptavidine-kinase est incubé avec les hybrides et après
10 lavage, les substrats de la kinase et la luciférase sont ajoutés afin de mesurer les conjugués kinase-streptavidine présent dans les puits. La figure 9 montre la pente de l'augmentation de lumière en RLU (Relative Light Unit) observé par heure d'incubation de ces réactifs. Les contrôles
15 ont été réalisés avec un ADN cible de 571bp provenant du génome de souris.

Les tests ont été faits en 3 exemplaires et représentent la moyenne. Les écarts types (\pm s) sont indiqués sur la figure. La figure montre que 1 pg de DNA peut être
20 détecté significativement par ce test.

REVENDICATIONS

1. Conjugué actif destiné à la détection et/ou au dosage d'un composé biologique, caractérisé en ce qu'il est constitué par une kinase ou une déshydrogénase dont les
5 groupes soufres sont de préférence préalablement réduits, et capable de produire un composé intermédiaire utilisable par un système de bioluminescence, de préférence par une luciférase, ladite enzyme étant couplée à un ligand, préalablement activé par un agent de couplage, et susceptible
10 de se lier directement ou indirectement, de manière spécifique au dit composé biologique.

2. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce que la kinase est une pyruvate kinase.

3. Conjugué selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'agent de couplage est
15 hétérobifonctionnel.

4. Conjugué selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'agent de couplage est le N-Succinimidyl 3- (2-pyridyldithio) proprionate, le Succinimidyl 4- (N-maleimidométhyl) cyclohexane -1 - carboxylate ou son
20 sulfodérivé.

5. Conjugué selon l'une quelconques des revendications précédentes caractérisé en ce que le ligand est choisi parmi les groupes constitués par les antigènes, les
25 récepteurs d'hormones, les anticorps, les séquences nucléotidiques, les composés capables de se fixer à des séquences nucléotidiques biotinylées et/ou un mélange d'entre eux.

6. Conjugué selon la revendication 5 caractérisé
30 en ce que le ligand est de l'avidine ou de la streptavidine, éventuellement modifiée(s).

7. Conjugué selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique comprend tout ou une partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi le
35 groupe constitué par les séquences nucléotidiques suivantes:

la SEQ ID N°1 : TGTCCAACAA TCTGCAGACA TTATA.

la SEQ ID N°2 : ACACCTTCTT ACACCTCTCT AATAT

la SEQ ID N°3 : CCAACCTTTT AGATGCGTGC CAGGA

1a SEQ ID N°4 : TACTACATAC ACCCCCCGCAC AGACC
 1a SEQ ID N°5 : GGTTCGCAAA TCTACGCACG GTCCT
 1a SEQ ID N°6 : ATGATGTATG TGGGGGCGTG TGTGG
 1a SEQ ID N°7 : ACCTTAACTG CAGATGTTAT G
 5 1a SEQ ID N°8 : TGGGAATTGAC GTCTACAATA C
 1a SEQ ID N°9 : ATATCAGATG ACCGAGAACGA AAATG
 1a SEQ ID N°10 : TATAGTCTAC TGCTCTTGCT TTTAC
 1a SEQ ID N°11 : UGUGCAACAA UGUGCAGACA UUAUA
 1a SEQ ID N°12 : ACACGUUGUU ACACGUCUGU AAUAU
 10 1a SEQ ID N°13 : CCAAGCGUUU AGAUGCGUGC CAGGA
 1a SEQ ID N°14 : UACUACAUAC ACCCCCCGCAC AGACC
 1a SEQ ID N°15 : GGUUCGCAAA UCUACGCACG GUCCU
 1a SEQ ID N°16 : AUGAUGUAUG UGGGGGCGUG UGUGG
 1a SEQ ID N°17 : ACCUUAACUG CAGAUGUUAU G
 15 1a SEQ ID N°18 : UCGAAUUCAC GUCUACAAUA C
 1a SEQ ID N°19 : AUAUCAGAUG ACCGAGAACGA AAAUG
 1a SEQ ID N°20 : UAUACUCUAC UGCUCUUGCU UUUAC

8. Procédé de préparation du conjugué selon l'une
 quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce
 20 que on fait réagir en solution un agent de couplage, de
 préférence hétérobifonctionnel sur un ligand et en ce que ce
 ligand activé est couplé à une kinase ou une déshydrogénase
 dont un ou plusieurs ponts sulfures ont été éventuellement
 réduits.

25 9. Procédé de préparation du conjugué selon la
 revendication 8 caractérisé en ce que la kinase ou la
 déshydrogénase du conjugué est immobilisé au niveau de son
 site actif sur une colonne contenant un gel, de préférence
 le Blue Sépharose, ayant une affinité pour la kinase ou la
 30 déshydrogénase et est couplée au ligand préalablement activé
 par un agent de couplage et en ce que la colonne est lavée
 et le conjugué est élué de la colonne en changeant la
 composition de la solution de lavage, de préférence en
 augmentant la force ionique.

35 10. Application du conjugué selon l'une quelconque
 des revendications 1 à 7 pour la détection et/ou le dosage
 d'un composé biologique.

11. Application selon la revendication 10 pour la

détection et/ou le dosage par hybridation de séquences nucléotidiques.

12. Application selon la revendication 11 pour la détection et/ou le dosage de séquences nucléotidiques, 5 préalablement détectées par un procédé choisi parmi le groupe constitué par l'hybridation in situ, l'hybridation sur filtre, sur plastique, sur support solide, en solution, en "sandwich" sur gel, l'hybridation en Dot blot, Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non-isotopique 10 associé au fragment, par technique sondes froides, par amplification génétique, notamment par PCR ou LCR et/ou par un mélange d'entre eux.

13. Trousse de détection et/ou de dosage d'un composant biologique caractérisé en ce qu'il comprend le 15 conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

14. Trousse de diagnostic selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'elle comprend également les réactifs destinés à la détection et/ou au dosage de séquences nucléotidiques par un procédé choisi parmi le groupe 20 constitué par l'hybridation in situ, l'hybridation sur filtre, sur support solide, en solution, en "sandwich" sur gel, l'hybridation en Dot blot, Northern blot, Southern blot, par un marquage isotopique ou non-isotopique associé au fragment, par technique sondes froides, par amplification 25 génétique, notamment par PCR ou LCR et/ou un mélange d'entre eux.

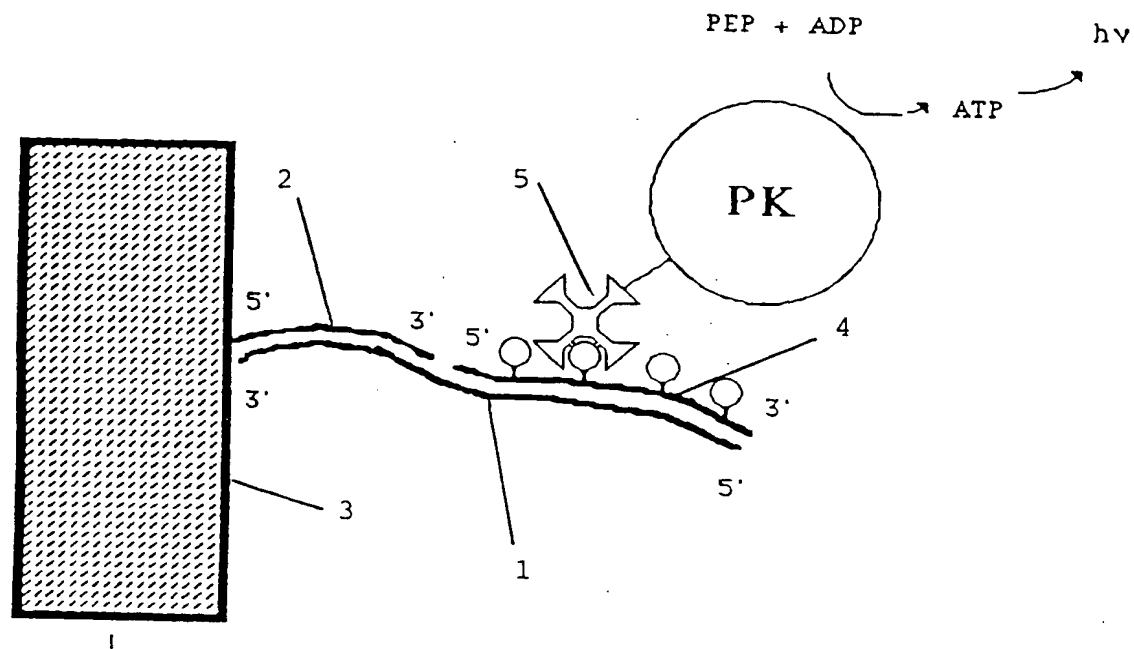


FIG.1

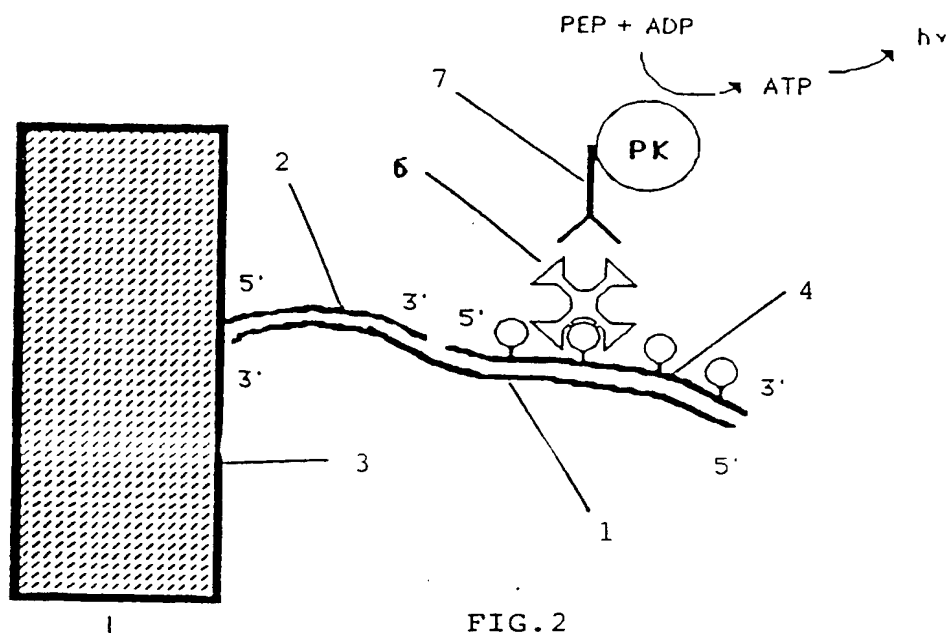


FIG.2

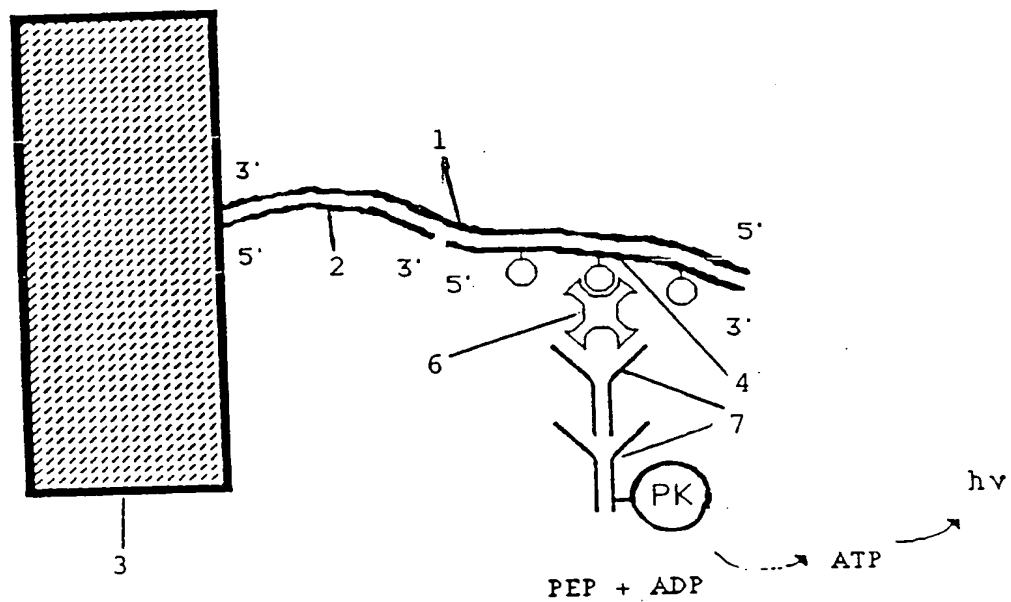


FIG. 3

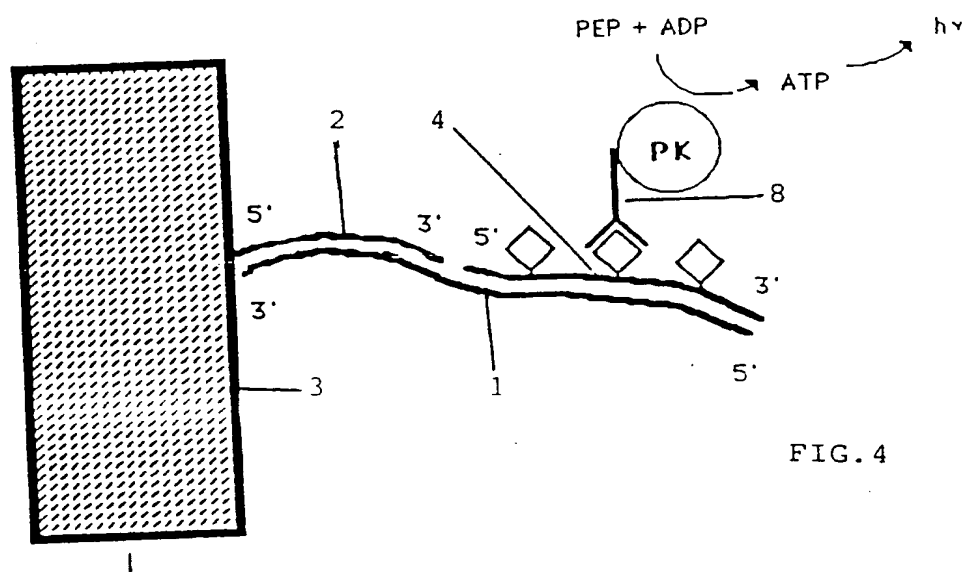


FIG. 4

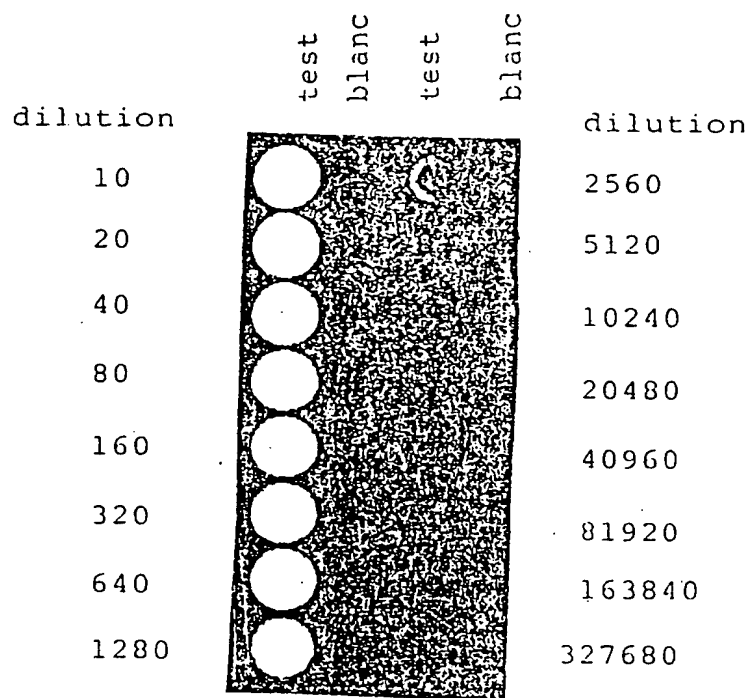


FIG 5.

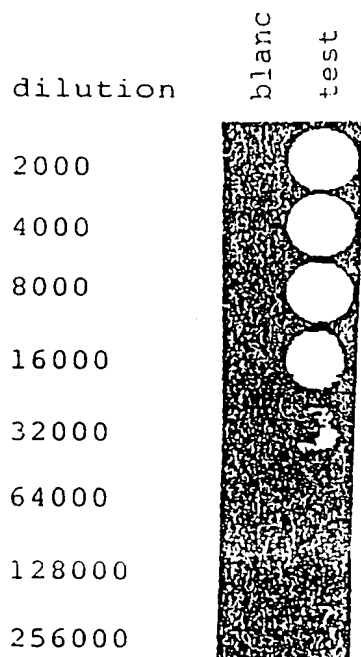


FIG.6

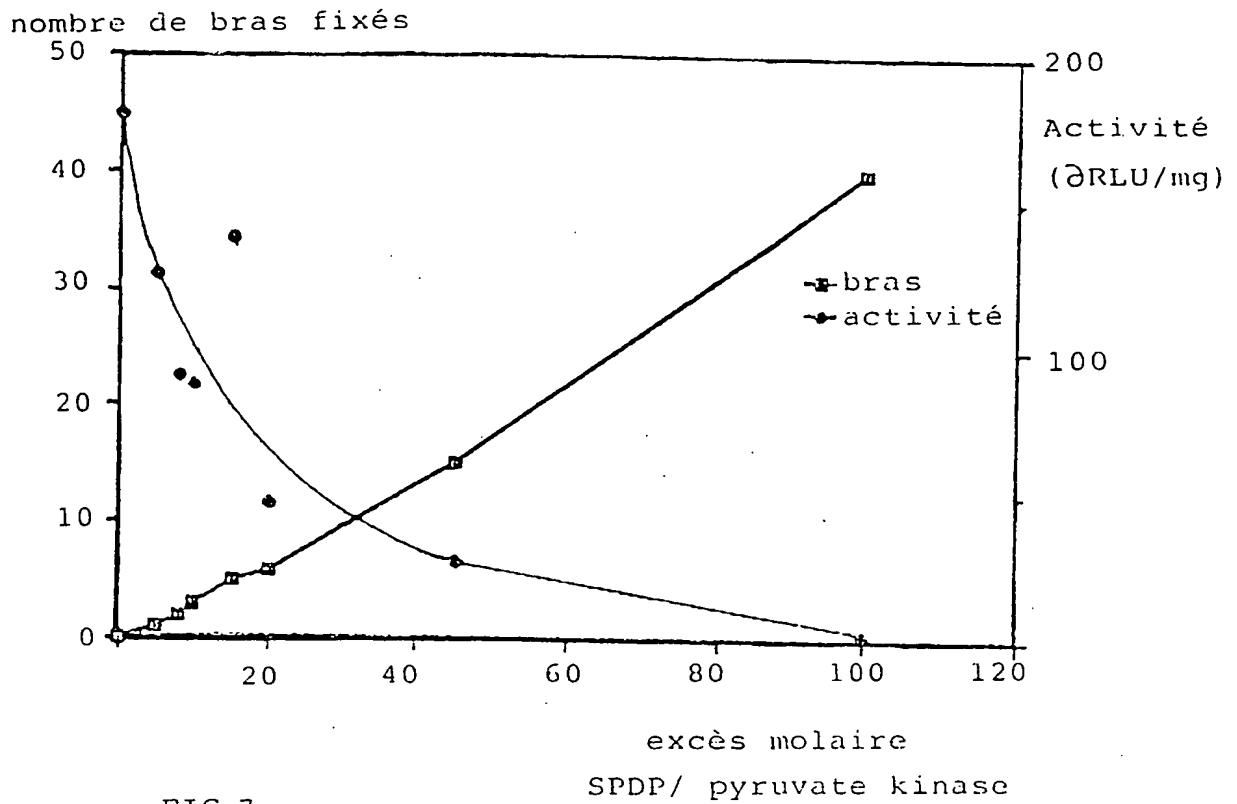


FIG 7

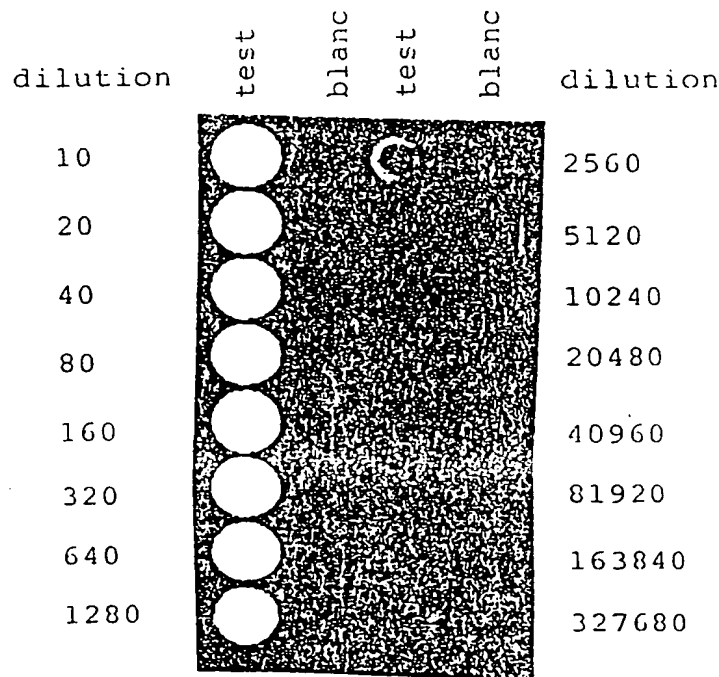
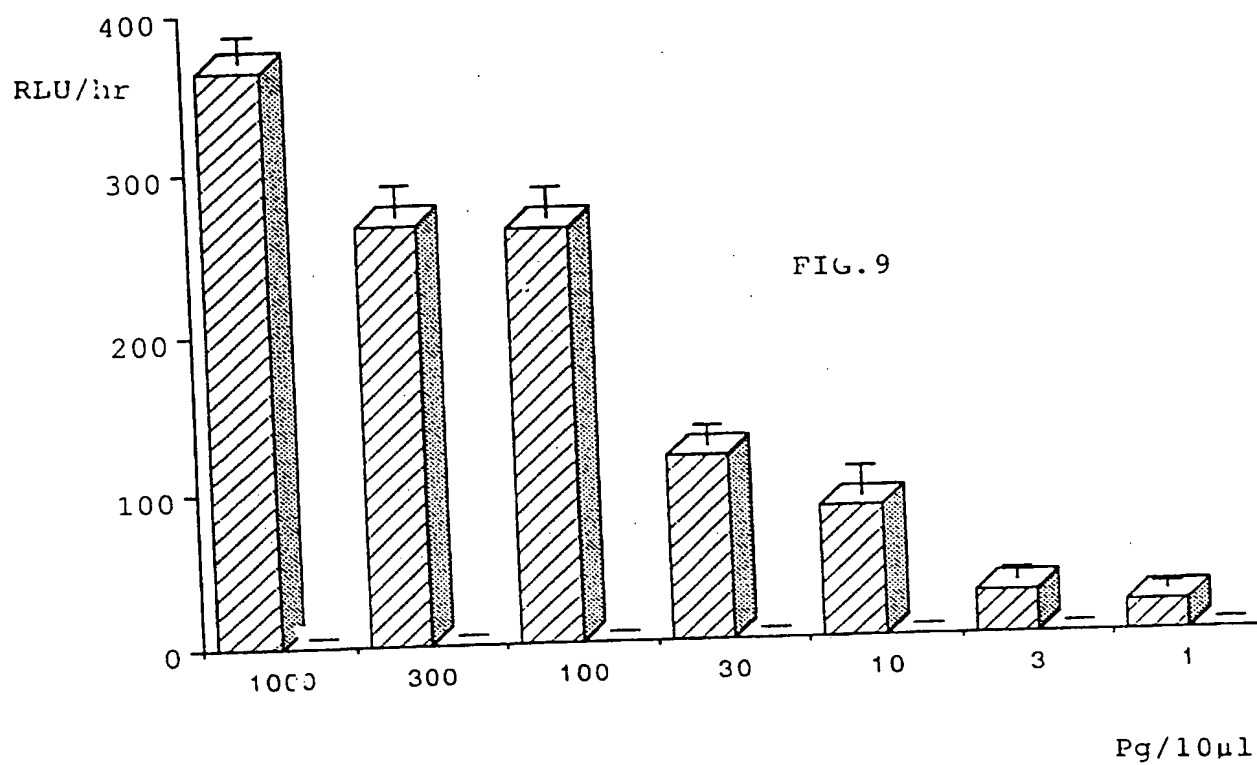


FIG.8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EE 93/00063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12Q1/68 G01N33/535 C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 362 042 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 4 April 1990 cited in the application see claims ---	1-6, 8-10,13
Y	EP,A,0 304 934 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 1 March 1989 cited in the application see column 18 - column 19; claims ---	1-6
Y	EP,A,0 137 515 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION) 17 April 1985 cited in the application see claims; example 4 --- -/--	1,5,10, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 1993

Date of mailing of the international search report

24. 11. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/BE 93/00063

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 123 300 (ENZO BIOCHEM., INC.) 31 October 1984 see abstract ---	9
A	EP,A,0 431 882 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 12 June 1991 cited in the application see the whole document ---	1,5,10
Y	EP,A,0 254 172 (MILES LABORATORIES) 27 January 1988 cited in the application see page 6, line 35 - line 55 -----	1,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No

PCT 93/00063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0362042	04-04-90	FR-A- 2636970	30-03-90
EP-A-0304934	01-03-89	NONE	
EP-A-0137515	17-04-85	AU-B- 590511	09-11-89
		AU-A- 3420384	18-04-85
		CA-A- 1234756	05-04-88
		JP-A- 61022254	30-01-86
EP-A-0123300	31-10-84	AU-A- 2716184	25-10-84
		JP-A- 59224564	17-12-84
EP-A-0431882	12-06-91	JP-A- 5084100	06-04-93
EP-A-0254172	27-01-88	US-A- 4810638	07-03-89
		CA-A- 1293441	24-12-91
		DE-A- 3774348	12-12-91
		JP-B- 5035990	27-05-93
		JP-A- 63045561	26-02-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D Internationale No
PCT/BE 93/00063

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12Q1/68 G01N33/535 C12Q1/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 362 042 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 4 Avril 1990 cité dans la demande voir revendications ---	1-6, 8-10, 13
Y	EP,A,0 304 934 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 1 Mars 1989 cité dans la demande voir colonne 18 - colonne 19; revendications ---	1-6
Y	EP,A,0 137 515 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION) 17 Avril 1985 cité dans la demande voir revendications; exemple 4 --- -/--	1, 5, 10, 13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Décembre 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24. 01. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Molina Galan, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 123 300 (ENZO BIOCHEM., INC.) 31 Octobre 1984 voir abrégé ---	9
A	EP,A,0 431 882 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 12 Juin 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,5,10
Y	EP,A,0 254 172 (MILES LABORATORIES) 27 Janvier 1988 cité dans la demande voir page 6, ligne 35 - ligne 55 -----	1,8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation internationale No

17/BE 93/00063

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0362042	04-04-90	FR-A- 2636970	30-03-90
EP-A-0304934	01-03-89	AUCUN	
EP-A-0137515	17-04-85	AU-B- 590511	09-11-89
		AU-A- 3420384	18-04-85
		CA-A- 1234756	05-04-88
		JP-A- 61022254	30-01-86
EP-A-0123300	31-10-84	AU-A- 2716184	25-10-84
		JP-A- 59224564	17-12-84
EP-A-0431882	12-06-91	JP-A- 5084100	06-04-93
EP-A-0254172	27-01-88	US-A- 4810638	07-03-89
		CA-A- 1293441	24-12-91
		DE-A- 3774348	12-12-91
		JP-B- 5035990	27-05-93
		JP-A- 63045561	26-02-88